

28. 9. 2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 11 NOV 2004

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年   9 月 3 0 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 3 4 0 0 9 2  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 3 4 0 0 9 2 ]

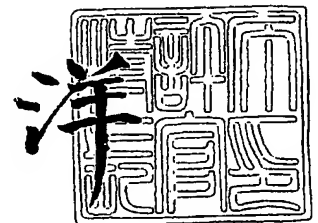
出 願 人            早 出   広 司  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 0 月 2 9 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号   出証特 2 0 0 4 - 3 0 9 7 8 4 2

【書類名】 特許願  
【整理番号】 PSD-0019  
【提出日】 平成15年 9月30日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都目黒区南 1 - 1 3 - 1 6  
    【氏名】 早出 広司  
【特許出願人】  
    【識別番号】 596153357  
    【氏名又は名称】 早出 広司  
【代理人】  
    【識別番号】 230104019  
    【弁護士】  
    【氏名又は名称】 大野 聖二  
    【電話番号】 03-5521-1530  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100106840  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 森田 耕司  
    【電話番号】 03-5521-1530  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100105991  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 田中 玲子  
    【電話番号】 03-5521-1530  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 185396  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

ピロロキノリンキノングルコース脱水素酵素 (PQQGDH) とシトクロームとの融合蛋白質。

**【請求項 2】**

前記 PQQGDH が *Acinetobacter calcoaceticus* 由来の水溶性 PQQGDH である、請求項 1 記載の融合蛋白質。

**【請求項 3】**

前記シトクロームが、PQQGDH の C 末端側に融合されている、請求項 1 または 2 に記載の融合蛋白質。

**【請求項 4】**

前記シトクロームが、シトクローム C またはシトクローム B562 である、請求項 1-3 のいずれかに記載の融合蛋白質。

**【請求項 5】**

前記シトクロームが、1 分子中に PQQ とヘムの両方を有する蛋白質であるキノヘモ蛋白質に由来する、請求項 1-4 のいずれかに記載の融合蛋白質。

**【請求項 6】**

前記シトクロームが、キノヘモ蛋白質アルコール脱水素酵素に由来する、請求項 1-5 のいずれかに記載の融合蛋白質。

**【請求項 7】**

前記シトクロームが、*Comamonas testosteroni* のキノヘモ蛋白質エタノールデヒドロゲナーゼに由来する、請求項 1-6 のいずれかに記載の融合蛋白質。

**【請求項 8】**

以下の (a) または (b) :

(a) 配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列からなる蛋白質;

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 もしくはそれ以上のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコース脱水素酵素活性および電子伝達機能を有する蛋白質

のいずれかである、請求項 1-7 のいずれかに記載の融合蛋白質。

**【請求項 9】**

請求項 1-8 のいずれかに記載の融合蛋白質をコードする遺伝子。

**【請求項 10】**

請求項 9 に記載の遺伝子を含むベクター。

**【請求項 11】**

請求項 9 に記載の遺伝子を含む形質転換体。

**【請求項 12】**

請求項 9 に記載の遺伝子が主染色体に組み込まれている形質転換体。

**【請求項 13】**

請求項 1-8 のいずれかに記載の融合蛋白質が装着一されている酵素電極。

**【請求項 14】**

試料中のグルコース濃度を測定する方法であって、  
試料を請求項 13 に記載の酵素電極と接触させ、そして  
グルコースの酸化に伴って発生する電子を測定する、  
ことを含む方法。

**【請求項 15】**

作用極として請求項 13 記載の酵素電極を用いることを特徴とするグルコースセンサー。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】グルコース脱水素酵素とシトクロームとの融合蛋白質

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明はグルコース脱水素酵素とシトクロームとの融合蛋白質、およびこれを用いるグルコースのアッセイに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーとして臨床診断上極めて重要な指標である。また、微生物を用いる発酵生産におけるグルコース濃度の定量がプロセスモニタリングにおいて重要な項目となっている。ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素 (PQQGDH) はグルコースに対して高い酸化活性を有していること、および PQQGDH は補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酸素を必要としないことから、グルコースセンサーの認識素子をはじめとして、アッセイ分野への応用が期待されている。

## 【0003】

PQQGDH をその表面に固定化した酵素電極を用いてグルコースをアッセイするためには、PQQGDH の酸化還元中心である PQQ から電極に電子を伝達させるために、測定系に電子メディエータを加える必要がある。このため、電子メディエータの安定性や溶解性により電極の特性が制限されたり、夾雑物と電子メディエータとの反応により測定のバックグラウンドが高くなるという欠点がある。さらに電子メディエータはインビボでの使用に適していないため、体内埋込型のグルコースセンサーにおける PQQGDH の適用が制限されていた。この問題を解決するために、PQQGDH を電子伝達蛋白質とともに電極上に固定化する方法が提案されている (WO 02/073181)。しかし、この方法においては大過剰モルの電子伝達蛋白質を用いる必要があるため、コストが高いという難点があった。したがって、当該技術分野においては、電子メディエータを必要としない“直接電子伝達型”のグルコースセンサー用の素子が求められている。

## 【0004】

本発明に関連する先行技術文献情報としては以下のものがある。

【特許文献 1】WO 02/073181

【非特許文献 1】J. Okuda, J. Wakai, N. Yuhashi, K. Sode, Biosensors &amp; Bioelectronics 18 (2003) 699-704

【非特許文献 2】J. Okuda, J. Wakai, K. Sode, Anal. Lett. 35 (2002) 1465-1478

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明は、電子メディエータを必要としない直接電子伝達型のグルコースセンサーの製造を可能とする改変型 PQQGDH を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本発明は、ピロロキノリンキノングルコース脱水素酵素 (PQQGDH) とシトクロームとの融合蛋白質を提供する。好ましくは、PQQGDH は、Acinetobacter calcoaceticus 由来の水溶性 PQQGDH である。

## 【0007】

本発明の融合蛋白質においては、シトクロームは、好ましくは PQQGDH の C 末端側に融合されている。また好ましくは、シトクロームはシトクローム C またはシトクローム B562 である。特に好ましくは、シトクロームは、1 分子中に PQQ とヘムの両方を有する蛋白質であるキノヘモ蛋白質に由来するものである。また好ましくは、シトクロームは、キノヘモ蛋白質アルコール脱水素酵素に由来するものである。特に好ましくは、シトクロームは、Comamonas testosteroni のキノヘモ蛋白質エタノールデヒドロゲナーゼの電

子伝達ドメインに由来するものである。

【0008】

また好ましくは、本発明の融合蛋白質は、以下の (a) または (b) :

(a) 配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列からなる蛋白質;

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 もしくはそれ以上のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコース脱水素酵素活性および電子伝達機能を有する蛋白質のいずれかである。

【0009】

別の観点においては、本発明は、本発明の融合蛋白質をコードする遺伝子、この遺伝子を含むベクターならびに形質転換体を提供する。好ましくは、融合蛋白質をコードする遺伝子は形質転換体の主染色体に組み込まれている。

【0010】

さらに別の観点においては、本発明は、本発明の融合蛋白質が装着されている酵素電極、ならびにこのような酵素電極を用いることを特徴とするグルコースセンサーを提供する。

【0011】

本発明はまた、試料中のグルコース濃度を測定する方法であって、試料を上述の酵素電極と接触させ、そしてグルコースの酸化に伴って発生する電子を測定する、ことを含む方法を提供する。

【0012】

本発明の融合蛋白質を用いることにより、電子メディエータを必要としない直接電子伝達型のグルコースセンサーを製造することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

融合蛋白質の構造

本発明の融合蛋白質は、PQQGDH とシトクロームとが連結された構造を有しており、必要に応じてこれらの間にリンカー部分が存在していてもよい。

【0014】

PQQGDH とは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。PQQGDH には、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性 PQQGDH は、分子量約 87 kDa のシングルペプチド蛋白質であり、種々のグラム陰性菌において広く見いだされている。一方、水溶性 PQQGDH は *Acinetobacter calcoaceticus* のいくつかの株においてその存在が確認されており (*Biosci. Biotech. Biochem.* (1995), 59 (8), 1548-1555)、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている (*Mol. Gen. Genet.* (1989), 217: 430-436)。本発明においては、これらのいずれの PQQGDH も用いることができる。

【0015】

さらに、PQQGDH においては、アミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。特定の領域のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換することにより、グルコースを酸化する酵素活性を維持したまま、酵素の熱安定性や基質に対する親和性を改良しうることが明らかにされている (例えば、特開 2000-350588、特開 2001-197888、特開 2000-312588 を参照)。本発明の融合蛋白質においては、これらの改変された PQQGDH を用いてもよい。

【0016】

シトクロームとは、電子伝達体としての機能を有するヘム蛋白質をいう。とりわけ、蛋白質分子にヘム鉄が一つあるいは複数、共有結合あるいは非共有結合的に結合している蛋

白質分子である。種々の生物から、シトクローム b、シトクローム c 等の多くの種類のシトクロームが単離同定されており、これらのいずれも本発明において用いることができる。例としては、E. coli B 株 (Eur. J. Biochem. 202 (2), 309-313 (1991))、E. coli K 株 (Tower, M.K., Biochem. Biophys. Acta. 1143, 109-111 (1993)) Acinetobacter calcoaceticus、Klebsiella pneumoniae、S. typhi、S. typhimurium、K. pneumoniae、Y. pestis、P. multocida、S. pneumoniae 等の細菌に由来するシトクローム b 562 が挙げられる。また、これらのシトクロームから作製されるキメラ蛋白質を用いてもよい。

#### 【0017】

さらに、電子移動サブユニットまたはヘム含有ドメインを有する酸化還元酵素が知られており、これらの酵素のヘム蛋白質サブユニットまたはヘム蛋白質ドメインも、本発明におけるシトクロームに含まれる。特に、PQQ を補酵素とする蛋白質のうち、蛋白質分子中に PQQ 以外にヘム鉄を結合しているシトクロームを有するキノヘム蛋白質のシトクロームドメインも含まれる。さらにキノヘム蛋白質のうち、アルコール脱水素酵素活性を有するキノヘムアルコール脱水素酵素のシトクロームドメインも含まれる。またそのような酸化還元酵素の例としては、エタノールデヒドロゲナーゼおよびオリゴサッカライドデヒドロゲナーゼなどが挙げられる。

#### 【0018】

特に好ましくは、Comamonas testosteroni のキノヘムエタノールデヒドロゲナーゼ (QHEDH) のシトクローム c ドメインを用いることができる。最近 QHEDH の 3D 構造が明らかにされた (J. Biol. Chem., 277, 2002, 3727-3732)。QHEDH は 2 つの異なるドメインから構成される。第 1 ドメインは PQQ 含有触媒ドメインであり、PQQ GDH と類似する 8 枚羽根の  $\beta$  プロペラ構造から構成される。C 末端領域に位置する第 2 ドメインはシトクローム c ドメインである。これらのドメインは、ペプチドリンカー領域により分離されている。QHEDH においては、酸化還元中心である PQQ から電子受容体であるシトクローム c を介して、呼吸鎖に電子が伝達される。

#### 【0019】

また、本発明において用いられるシトクロームは、天然のシトクロームの構造の一部が改変されている改変型シトクロームであってもよい。このような改変型シトクロームは、例えば、天然に生ずるシトクロームの 1 またはそれ以上のアミノ酸残基を他の天然のまたは天然に存在しないアミノ酸残基で置換することにより、あるいは 1 またはそれ以上のアミノ酸を欠失させるかまたは付加することにより製造することができる。

#### 【0020】

リンカー部分とは、融合蛋白質中で PQQ GDH とシトクロームとを連結する部分である。リンカー部分は、PQQ GDH とシトクロームとを、GDH 活性が発揮されかつ PQQ からシトクロームへの電子の効率的な伝達が可能となるように配置させる機能を有する。リンカー部分の配列としては、天然または合成の任意のアミノ酸配列を用いることができる。例えば、PQQ GDH またはシトクロームに由来する適当な配列であってもよく、融合蛋白質をコードする遺伝子を構築するために用いたベクターに由来する配列であってもよい。

#### 【0021】

##### 融合蛋白質の製造方法

本発明の融合蛋白質は、PQQ GDH をコードする遺伝子配列とシトクロームをコードする遺伝子配列とを、必要に応じてリンカー部分を介して、インフレームとなるよう連結させて、これを組換え的に発現させることにより製造することができる。図 1 は、本発明の融合蛋白質の一例を、図 2 はこの融合蛋白質をコードする遺伝子の配列を示す。図中、5' 側から 3' 側に、PQQ GDH をコードする配列、リンカー部分、およびシトクロームをコードする配列が連結されている。Acinetobacter calcoaceticus 由来の天然の水溶性 PQQ GDH をコードする遺伝子の配列は、Mol. Gen. Genet. (1989), 217:430-436 に開示されており、Comamonas testosteroni のキノヘムエタノールデヒドロゲナーゼ (QHEDH) をコードする遺伝子の配列は、J. Biol. Chem., 277, 2002, 3727-3732 に開示

されている。これらの配列を基に、遺伝子操作により融合蛋白質をコードする遺伝子を構築することができる。遺伝子操作のための種々の方法は、当該技術分野においてよく知られている。

#### 【0022】

このようにして得た融合蛋白質をコードする遺伝子を、遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミド）に挿入し、これを適当な宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外来性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

#### 【0023】

融合蛋白質を発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎する。これを超遠心分離し、融合蛋白質を含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現した融合蛋白質を培養液中に分泌させることもできる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、HPLCなどにより精製することにより、本発明の融合蛋白質を調製する。

#### 【0024】

##### 酵素電極

本発明はまた、本発明にしたがう融合蛋白質が固定化された酵素電極を特徴とする。酵素電極とは、金電極、白金電極、カーボン電極等の電極表面上に酵素が固定化されている電極である。酵素電極は、酵素の反応特異性を利用して、種々の生理活性物質を特異的に検出するバイオセンサーとして広く用いられている。本発明の融合蛋白質は、酵素電極において被検物質（例えばグルコース）の存在を認識し、その酸化還元反応を触媒し、その結果生じる電子を電極に伝達するよう作用する。

#### 【0025】

酵素電極を作製するためには、電極上に本発明の融合蛋白質を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどのポリマー中に固定する方法などがあり、これらを組み合わせて用いてもよい。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の融合蛋白質をカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロックする。

#### 【0026】

##### グルコースセンサー

別の観点においては、本発明は、作用極として上述の本発明の酵素電極を用いることを特徴とするセンサーを提供する。本明細書において用いる場合、センサーとは、目的とする被検物質の濃度を電気化学的に測定する測定系をいい、通常は、作用極（酵素電極）、対極（白金等）、および参照極（Ag/AgCl等）の3電極を含む。あるいは、慣用の簡易血糖値システムにおいて用いられているような、作用極と対極とから構成される2電極系でもよい。センサーはさらに、緩衝液および被検試料を入れる恒温セル、作用極に電圧を印加する電源、電流計、記録計等を含む。センサーは、バッチ型であってもフロー型であってもよい。このような、酵素センサーの構造は、当該技術分野においてよく知られており、例えばBiosensors -Fundamental and Applications-Anthony P. F. Turner, Isao Karube and George S. Wilson, Oxford University Press 1987に記載されている。

#### 【0027】

##### グルコースのアッセイ

本発明のグルコースセンサーを用いるグルコースの濃度の測定は、以下のように行うことができる。センサーの恒温セルに緩衝液を入れ、一定温度に維持する。作用電極として本発明の融合蛋白質を固定化した酵素電極を用い、対極としては例えば白金電極を、参照電極としては例えばAg/AgCl電極を用いる。作用極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、恒温セルにグルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中の

グルコース濃度を計算することができる。

#### 【0028】

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0029】

#### 発現ベクターの構築:

PQQGDHの構造遺伝子(停止コドンを含まない)およびQHEDHの電子伝達ドメインは、5'末端に制限酵素認識部位を有するプライマーを用いて、それぞれ*A. calcoaceticus* LMD79.41、および*C. testosteroni* ATCC 15667のゲノムからPCR法により増幅した。用いたプライマーは以下のとおりである:

gdhB; センス

5'-GGCCATGGATAAACATTTATTGGCTAAAATTGCTTTAT-3' (配列番号3)

アンチセンス

5'-GGGGGAGCTCCTTAGCCTTATAGGTGAAC-3' (配列番号4)

qhcdhcytcドメイン; センス

5'-GGGGGAGCTCGCAAGGCCAGGATGCCGGA-3' (配列番号5)

アンチセンス

5'-GGGGAAGCTTTCAGGGCTTGGGCCGGATGG-3' (配列番号6)

#### 【0030】

これらのPCR産物を発現ベクターpTrc99A (Amersham Biosciences, Sweden)のマルチクローニングサイトに挿入して、発現ベクターpGBETを調製した。このようにして、PQQGDHのC末端側にリンカー領域を介してQHEDHのシトクロームcドメインが連結された融合遺伝子を構築した(図2)。PQQGDHをコードする配列は大文字で、シトクロームをコードする配列は小文字で示されており、制限酵素認識部位には二重下線が、リンカー領域には下線が施されている。PQQGDHとシトクロームcドメインとの間のリンカー領域は、QHEDHの天然の構造に由来する24アミノ酸残基から構成される。

#### 【0031】

ヘム含有シトクロームcを*E. coli*中で発現させるためには、ccm遺伝子の発現が必須であるため、Kmプロモータの制御下にシトクロームcの成熟に必要なccm遺伝子を有するプラスミドpEC86 (Professor Linda Toenye-Meyer, ETH Switzerlandより贈与)を用いて、ccmが構成的に発現されるようにした。

#### 【0032】

pGBETをpEC86とともに*E. coli* DH5 $\alpha$ を形質転換した。融合蛋白質発現ベクターとccm発現ベクターの両方を有する形質転換体はピンク色を呈し、成熟シトクロームcが細胞内で産生されていることが示唆された。

#### 【0033】

#### 融合蛋白質の発現および精製

形質転換体をMMI培地で半好気条件下で30℃で10時間培養し、菌体を回収して、10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)に再懸濁した。これをフレンチプレスで破壊し(110MPa)、超遠心分離(160,500 $\times$ g, 1.5h, 4℃)し、上清を10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で透析した。得られた上清を10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で平衡化したResource Sカチオン交換カラム(Amersham Biosciences)に負荷し、5-150mM NaCl/10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)の勾配を用いて酵素を溶出した。

#### 【0034】

精製酵素はSDS-PAGEで約65kDaに1本のバンドを示し、これは融合蛋白質



について予測された分子量と一致した。さらにこのバンドは、ヘム染色により染色された。

#### 【0035】

精製融合蛋白質のUV/Vissスペクトルは、波長411nmの酸化型シトクロームcのピークを示した。還元剤であるヒドロ亜硫酸ナトリウムを加えると、融合蛋白質が還元されて、還元型シトクロームcに典型的な416nm, 522nmおよび551nmのピークを示した。このことから、融合蛋白質はヘムを有しており、シトクロームcとして機能することが確認された。

#### 【0036】

次に、PQQとシトクロームcドメインとの間の分子内電子伝達を調べるために、酸化型の融合蛋白質にグルコースを加えた。電子受容体非存在下でグルコース20mMを添加すると、時間とともにシトクロームcのスペクトルが酸化型から還元型に変化した。この結果は、融合蛋白質がGDH活性を有しており、かつ、グルコースの酸化に伴って酸化還元中心であるPQQからシトクロームcに分子内電子移動が生じたことを示す。

#### 【0037】

##### 酵素活性の測定

酵素活性の測定は10mM MOPS-NaOH緩衝液(pH7.0)中において0.06mMDCIPおよび0.6mMPMSを用いて行った。1分間に1 $\mu$ molのグルコースを酸化する酵素の活性を1ユニットと定義した。表1に精製酵素の動力学的パラメータを示す。

【表1】

	Km(mM)	Vmax(U/mg)	Vmax/Km
グルコース	23	3057	133
マルトース	15	1721	114
ラクトース	19	1584	82

#### 【0038】

本発明の融合蛋白質は約3000U/mg蛋白質のGDH活性を有しており、これは野生型PQQGDHの活性の約70%に相当する。また、融合蛋白質のグルコースに対するKm値および基質特異性は、野生型(Biocatal. Biotransform. 20, (2002), 405-412)のものと同様であった。

#### 【0039】

##### 酵素電極

次に、融合蛋白質が電極に電子を伝達する能力を調べた。500ユニットのGBETを含有する20mMMOPS緩衝液(pH7.0)をカーボンペースト(0.5gグラファイト粉末、0.3ml液体パラフィン, BSA Inc., West Lafayette, USA)とともに混合し、凍結乾燥した。対照としては、野生型PQQGDHと等モルのcytb562またはcytb562と同質量のBSAを用いた。次に、凍結乾燥した混合物をカーボンペースト電極の末端に充填した(直径3mm, BAS Inc.)。電極は、使用するまで20mMMOPS緩衝液(pH7.0)中で4°Cで保存した。測定は、1mM CaCl<sub>2</sub>を含む20mMMOPS緩衝液(pH7.0)中で25°Cで行った。+300mV vs. Ag/AgClの電圧を印加して、グルコースの添加に伴う電流値の増加を測定した。

## 【0040】

本発明の融合蛋白質を固定化した酵素電極は、グルコースの添加に対する迅速な応答を示し、グルコースを添加してから10秒以内にセンサーシグナルは定常電流に達した(図3)。図中、矢印はグルコースの添加を示す。一方、対照である野生型PQQGDHとcytb562またはBSAを固定化した電極では、電流の増加は観察されなかった。

## 【0041】

グルコースアッセイ

種々の濃度のグルコース溶液を用いて、本発明のセンサーのキャリブレーションカーブを求めた(図4)。図中、「GBET」は本実施例で作製した融合蛋白質を、「GBwt」は対照である野生型PQQGDHを表す。観察された電流増加は、最小の検出可能な濃度である0.01mMから5mMまでの濃度範囲で、グルコース濃度に比例していた。さらに、電流応答は酵素量に依存していた。センサーの感度は $9.65 \mu A M^{-1} cm^{-2}$ であった。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0042】

本発明の融合蛋白質、およびこれを利用した酵素電極ならびにバイオセンサーは、血糖値を測定する直接電子伝達型のグルコースセンサーとして有用である。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0043】

【図1】 図1は、融合蛋白質の構造の例を示す。

【図2】 図2は、図1に示す融合蛋白質をコードする遺伝子の配列を示す。

【図3】 図3は、本発明のグルコースセンサーの応答電流を示す。

【図4】 図4は、本発明のグルコースセンサーのキャリブレーションカーブを示す。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Sode, Koji  
 <120> Glucose Dehydrogenase  
 <130> PSD-0019  
 <160> 6  
 <170> PatentIn version 3.1  
 <210> 1  
 <211> 1776  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220>  
 <223> DNA coding for fugion protein  
 <400> 1  
 atgaataaac atttattggc taaaattgct ttattaagcg ctgttcagct agttacactc 60  
 tcagcatttg ctgatgttcc tctaactcca tctcaatttg ctaaagcgaa atcagagaaac 120  
 tttgacaaga aagttattct atctaactta aataagccgc atgctttgtt atgggggacca 180  
 gataatcaaa tttgggttaac tgagcgagca acaggtaaga ttctaagagt taatccagag 240  
 tcgggtagtg taaaaacagt ttttcaggta ccagagattg tcaatgatgc tgatgggcag 300  
 aatggtttat taggttttgc cttccatcct gattttaaaa ataatcctta tatctatatt 360  
 tcaggtacat ttaaaaatcc gaaatctaca gataaagaat taccgaacca aacgattatt 420  
 cgtcgttata cctataataa atcaacagat acgctcgaga agccagtcga tttattagca 480  
 ggattacctt catcaaaaaga ccatcagtcg ggtcgtcttg tcattgggccc agatcaaaaag 540  
 atttattata cgattgggtga ccaagggcgt aaccagcttg cttatttgtt cttgccaaat 600  
 caagcacaaac atacgccaac tcaacaagaa ctgaatggta aagactatca cacctatatg 660  
 ggtaaagtac tacgcttaaa tcttgatgga agtattccaa aggataatcc aagttttaac 720  
 ggggttggtta gccatattta tacacttgga catcgtaatc cgcagggcctt agcattcact 780  
 ccaaattggta aattattgca gtctgaacaa ggcccaaact ctgacgatga aattaacctc 840  
 attgtcaaaag gtggcaatta tgggtggccg aatgtagcag gttataaaga tgatagtggc 900  
 tatgcttatg caaattattc agcagcagcc aataagtcaa ttaaggattt agctcaaaat 960  
 ggagtaaaag tagccgcagg ggtccctgtg acgaaagaat ctgaatggac tggtaaaaac 1020  
 tttgtccac cattaaaaac tttatatacc gttcaagata cctacaacta taacgatcca 1080  
 acttgtggag agatgaccta ctttgcctgg ccaacagttg caccgtcatc tgcctatgtc 1140  
 tataagggcg gtaaaaaagc aattactggt tgggaaaata cattattggt tccatcttta 1200  
 aaacgtggtg tcattttccg tattaagtta gatccaactt atagcactac ttatgatgac 1260  
 gctgtaccga tgtttaagag caacaaccgt tatcgtgatg tgattgcaag tccagatggg 1320  
 aatgtcttat atgtattaac tgatactgcc ggaaatgtcc aaaaagatga tggctcagta 1380  
 acaaatacat tagaaaaccc aggatctctc attaagttca cctataaggc taaggagctc 1440  
 ggcaaggcca ggatgccgga gttcgtggcc cagcgcaccg gccagttgct gcagggcgtg 1500  
 aaatacgacc ccgccaaggc cgaggccggc accatgctgt atgtggccaa ctgcgttttc 1560  
 tgtcacggcg tgcctggcgt ggaccgtggc ggaaacattc ccaatctggg ttacatggac 1620  
 gcgagctata tcgagaacct gccaaacttt gtcttcaagg gcccgccat ggtgcgcggc 1680  
 atgccggact tcacgggcaa gttgtcgggc gatgacgtgg agtccctcaa ggccttcac 1740  
 cagggcacgg cggacgcat ccggcccaag ccctga 1776  
 <210> 2  
 <211> 591  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <220>  
 <223> fugion protein

&lt;400&gt; 2

Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Ala Leu Leu Ser Ala Val Gln  
 1 5 10 15  
 Leu Val Thr Leu Ser Ala Phe Ala Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln  
 20 25 30  
 Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser  
 35 40 45  
 Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile  
 50 55 60  
 Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu  
 65 70 75 80  
 Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp  
 85 90 95  
 Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe  
 100 105 110  
 Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys  
 115 120 125  
 Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr  
 130 135 140  
 Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala  
 145 150 155 160  
 Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly  
 165 170 175  
 Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln  
 180 185 190  
 Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln  
 195 200 205  
 Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu  
 210 215 220  
 Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn  
 225 230 235 240  
 Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly  
 245 250 255  
 Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro  
 260 265 270  
 Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly  
 275 280 285  
 Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala  
 290 295 300  
 Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn  
 305 310 315 320  
 Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp  
 325 330 335  
 Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln  
 340 345 350  
 Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile  
 355 360 365  
 Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly  
 370 375 380  
 Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu

385					390				395						400	
Lys	Arg	Gly	Val	Ile	Phe	Arg	Ile	Lys	Leu	Asp	Pro	Thr	Tyr	Ser	Thr	
				405					410					415		
Thr	Tyr	Asp	Asp	Ala	Val	Pro	Met	Phe	Lys	Ser	Asn	Asn	Arg	Tyr	Arg	
			420					425					430			
Asp	Val	Ile	Ala	Ser	Pro	Asp	Gly	Asn	Val	Leu	Tyr	Val	Leu	Thr	Asp	
			435				440						445			
Thr	Ala	Gly	Asn	Val	Gln	Lys	Asp	Asp	Gly	Ser	Val	Thr	Asn	Thr	Leu	
			450			455					460					
Glu	Asn	Pro	Gly	Ser	Leu	Ile	Lys	Phe	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Glu	Leu	
465					470					475					480	
Gly	Lys	Ala	Arg	Met	Pro	Glu	Phe	Val	Ala	Gln	Arg	Thr	Gly	Gln	Leu	
				485					490					495		
Leu	Gln	Gly	Val	Lys	Tyr	Asp	Pro	Ala	Lys	Val	Glu	Ala	Gly	Thr	Met	
			500					505					510			
Leu	Tyr	Val	Ala	Asn	Cys	Val	Phe	Cys	His	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Asp	
			515				520					525				
Arg	Gly	Gly	Asn	Ile	Pro	Asn	Leu	Gly	Tyr	Met	Asp	Ala	Ser	Tyr	Ile	
			530			535					540					
Glu	Asn	Leu	Pro	Asn	Phe	Val	Phe	Lys	Gly	Pro	Ala	Met	Val	Arg	Gly	
545					550					555					560	
Met	Pro	Asp	Phe	Thr	Gly	Lys	Leu	Ser	Gly	Asp	Asp	Val	Glu	Ser	Leu	
				565					570					575		
Lys	Ala	Phe	Ile	Gln	Gly	Thr	Ala	Asp	Ala	Ile	Arg	Pro	Lys	Pro		
			580					585					590			

**<210> 3**

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

ggccatggat aaacatttat tggctaaaat tgctttat

38

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

gggggagctc cttagcctta taggtgaac

29

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> PCR primer

<400> 5

gggggagctc ggcaaggcca ggatgccgga

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

ggggaagctt tcagggcttg ggccggatgg

30

【書類名】 図面

【図 1】

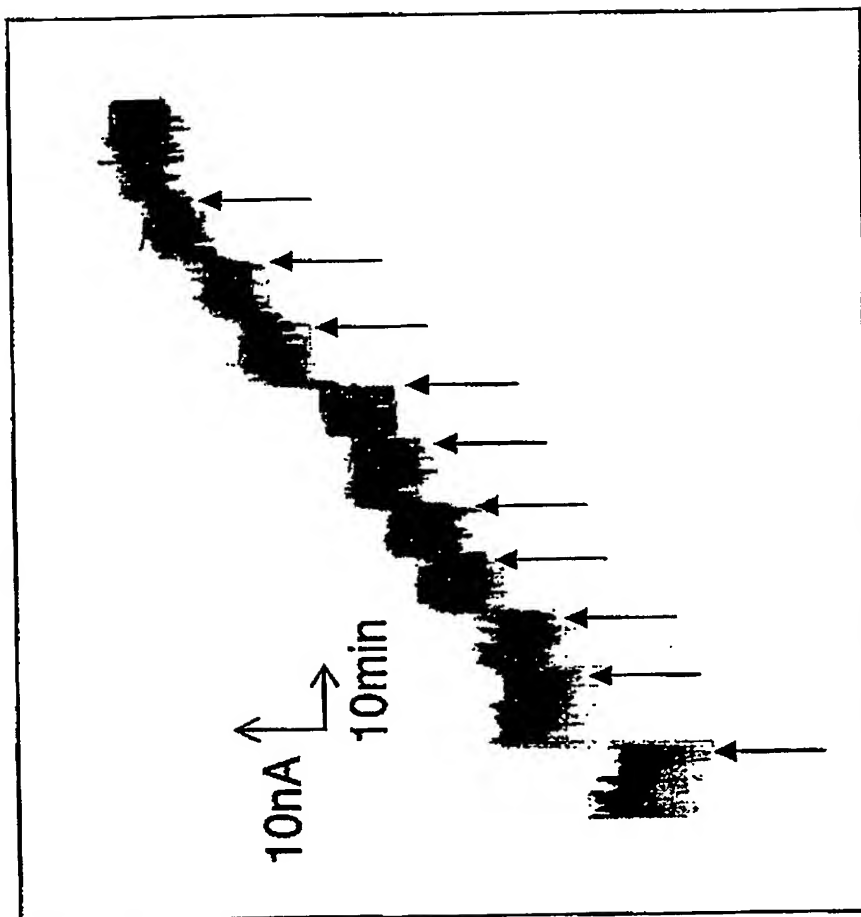
MNKHLLAKIALLSAVQLVTLISAFADVPLTPSQFAKAKSENFDDKKVILSNL  
NKPHELLWGPDNQIWLTERATGKILRVNPESGSVKTVFQVPEIVNDADGQ  
NGLLGFAFHPDFKNNPYIYISGTFKNPKSTDKELPNQTIIRRYTYNKSTD  
TLEKPVDLLAGLPSSSKDHQSGRLVIGPDQKIYYTIGDQGRNQLAYLFLPN  
QAQHTPTQQELNGKDYHTYMGKVLRLNLDGSIPKDNPSFNGVVSHIYTLG  
HRNPQGLAFTPNGKLLQSEQGPNSDDEINLIVKGGNYGWPNAVAGYKDDSG  
YAYANYSAAANKSIKDLAQNGVKVAAGVPVTKSESWTGKNFVPPKTLTYT  
VQDTYNYNDPTCGEMTYICWPTVAPSSAYVYKGGKKAITGWENTLLVPSL  
KRGVIFRIKLDPTYSTTYDDAVPMFKSNNRYRDVIASPDGNVLYVLTDTA  
GNVQKDDGSVTNTLENPGSLIXFTYKAKELgkarmpefvaqrtgqllqgv  
kydpakveagtmlyvancvfchgvpvgvdragnipnlgymdasyienlpnf  
vfkgpamvrgmpdftgklsgddveslkafiqgtadairpkp

【図2】

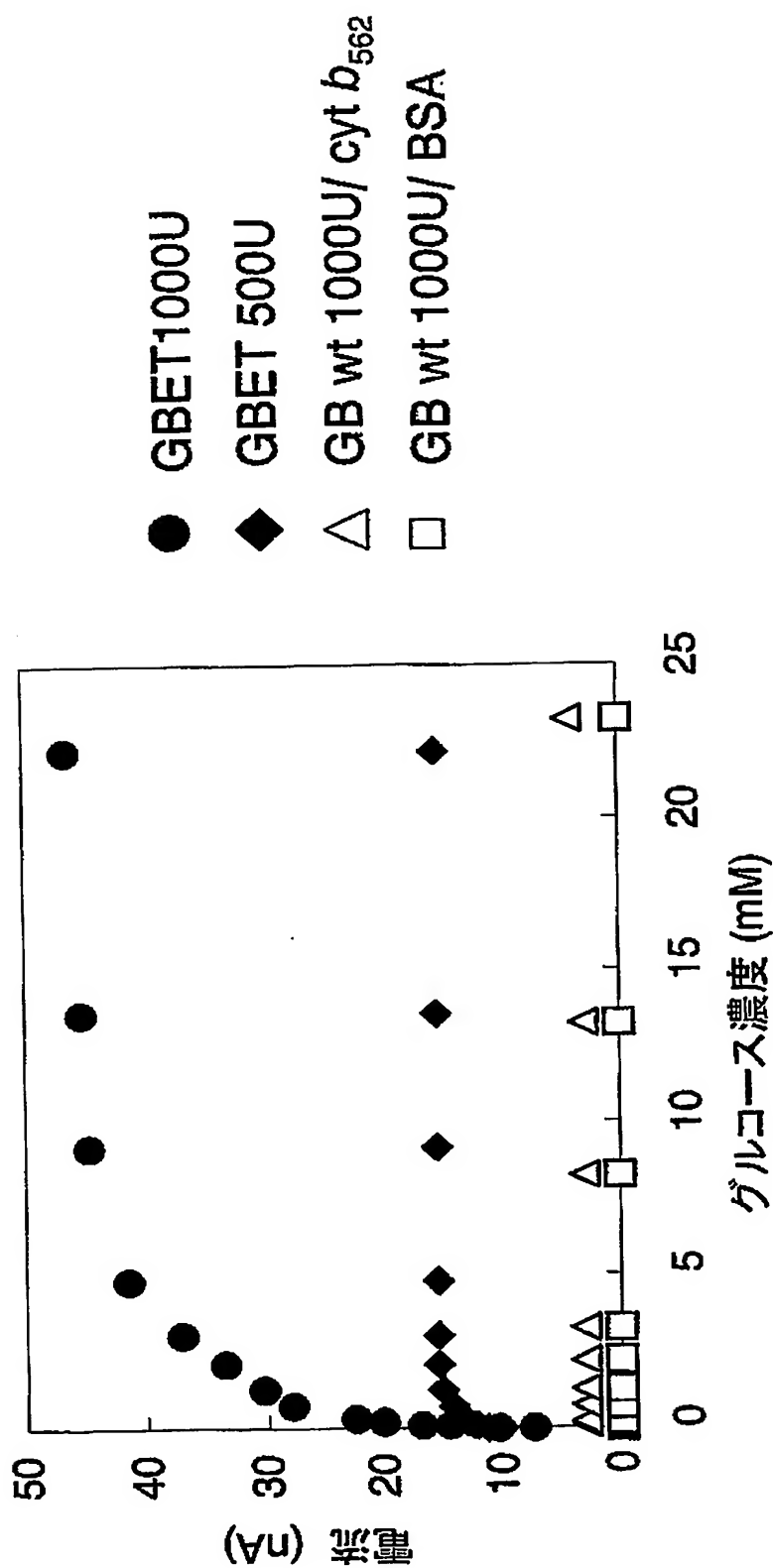
ATGAATAAAC	ATTTATTGGC	TAAAATTGCT	TTATTAAGCG	CTGTTCAGCT	AGTTACACTC
TCAGCATTTG	CTGATGTTCC	TCTAACTCCA	TCTCAATTTG	CTAAAGCGAA	ATCAGAGAAC
TTTGACAAGA	AAGTTATTCT	ATCTAATCTA	AATAAGCCGC	ATGCTTTGTT	ATGGGGACCA
GATAATCAAA	TTTGGTTAAC	TGAGCGAGCA	ACAGGTAAGA	TTCTAAGAGT	TAATCCAGAG
TCGGGTFAGT	TAAAAACAGT	TTTTTCAGGTA	CCAGAGATTG	TCAATGATGC	TGATGGGCAG
AATGGTTTAT	TAGGTTTTGC	CTTCCATCCT	GATTTTAAAA	ATAATCCTTA	TATCTATATT
TCAGGTACAT	TAAAAAATCC	GAAATCTACA	GATAAAGAAT	TACCGAACCA	AACGATTATT
CGTCGTTATA	CCTATAATAA	ATCAACAGAT	ACGCTCGAGA	AGCCAGTCGA	TTTATTAGCA
GGATTACCTT	CATCAAAAGA	CCATCAGTCA	GGTCGTCTTG	TCATTGGGCC	AGATCAAAAG
ATTTATTATA	CGATTGGTGA	CCAAGGGCGT	AACCAGCTTG	CTTATTTGTT	CTTGCCAAAT
CAAGCACAAC	ATACGCCAAC	TCAACAAGAA	CTGAATGGTA	AAGACTATCA	CACCTATATG
GGTAAAGTAC	TACGCTTAAA	TCTTGATGGA	AGTATTCCAA	AGGATAATCC	AAGTTTTAAC
GGGGTGGTTA	GCCATATTTA	TACACTTGGA	CATCGTAATC	CGCAGGGCTT	AGCATTCACT
CCAAATGGTA	AATTATTGCA	GTCTGAACAA	GGCCCAAAC	CTGACGATGA	AATTAACCTC
ATTGTCAAAG	GTGGCAATTA	TGGTTGGCCG	AATGTAGCAG	GTTATAAAGA	TGATAGTGGC
TATGCTTATG	CAAAATFATTC	AGCAGCAGCC	AATAAGTCAA	TTAAGGATTT	AGCTCAAAAT
GGAGTAAAAG	TAGCCGCAGG	GGTCCCTGTG	ACGAAAGAAT	CTGAATGGAC	TGGTAAAAAC
TTTGTCCCAC	CATTAAAAAC	TTTATATACC	GTTCAAGATA	CCTACAAC	TAACGATCCA
ACTTGTGGAG	AGATGACCTA	CATTTGCTGG	CCAACAGTTG	CACCGTCATC	TGCCTATGTC
TATAAGGGCG	GTAAAAAAGC	AATTACTGGT	TGGGAAAATA	CATTATTGGT	TCCATCTTTA
AAACGTGGTG	TCATTTTCCG	TATTAAGTTA	GATCCAAC	ATAGCACTAC	TTATGATGAC
GCTGTACCGA	TGTTTAAGAG	CAACAACCGT	TATCGTGATG	TGATTGCAAG	TCCAGATGGG
AATGTCTTAT	ATGTATTAAAC	TGATACTGCC	GGAAATGTCC	AAAAAGATGA	TGGCTCAGTA
ACAAATACAT	TAGAAAACCC	AGGATCTCTC	ATTAAGTTCA	CCTATAAGGC	<u>TAAGGAGCTC</u>
<u>ggcaaggcca</u>	<u>ggatgccgga</u>	<u>gttcgtggcc</u>	<u>cagcgcaccg</u>	<u>gccagttgct</u>	<u>gcagggcgctg</u>
<u>aaatacgacc</u>	<u>ccgccaaaggt</u>	<u>cgaggccggc</u>	<u>accatgctgt</u>	<u>atgtggccaa</u>	<u>ctgcgttttc</u>
<u>tgtcacggcg</u>	<u>tgcctggcgt</u>	<u>ggaccgtggc</u>	<u>ggaaacattc</u>	<u>ccaatctggg</u>	<u>ttacatggac</u>
<u>gcgagctata</u>	<u>tcgagaacct</u>	<u>gccaaacttt</u>	<u>gtcttcaagg</u>	<u>gcccggccat</u>	<u>ggtgcgcggc</u>
<u>atgccggact</u>	<u>tcacgggcaa</u>	<u>gttgctgggc</u>	<u>gatgacgtgg</u>	<u>agtccctcaa</u>	<u>ggccttcac</u>
<u>cagggcacgg</u>	<u>cggacgccat</u>	<u>ccggcccaag</u>	<u>ccctga</u>		



【図 3】



【図 4】



## 【書類名】要約書

## 【要約】

【課題】 電子メディエータを必要としない直接電子伝達型のグルコースセンサーの製造を可能とする改変型 PQQGDH を提供すること。

【解決手段】 ピロロキノリンキノングルコース脱水素酵素 (PQQGDH) とシトクロームとの融合蛋白質。PQQGDH としては、例えば、Acinetobacter calcoaceticus 由来の水溶性 PQQGDH を用いることができる。シトクロームとしては、例えば、Comamonas testosteroni のキノヘモ蛋白質エタノールデヒドロゲナーゼの電子伝達ドメインを用いることができる。本発明の融合蛋白質においては、酸化還元中心の PQQ からシトクロームに分子内電子移動が生ずる。

【選択図】 図 4

特願 2 0 0 3 - 3 4 0 0 9 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 6 1 5 3 3 5 7 ]

1. 変更年月日  
[変更理由]  
住 所  
氏 名

1 9 9 6 年 1 0 月 1 日  
新規登録  
東京都目黒区南 1 - 1 3 - 1 6  
早出 広司